

Capítulo 6

ULTRASSONS PARA O PREPARO DE AMOSTRAS

Mauro Korn
Dário Santos Júnior
Rodolfo de Melo Magalhães Santana
Francisco José Krug

6.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ULTRASSONS

Todas as ondas mecânicas se propagam através de meios materiais em sucessivos ciclos de compressão e rarefação. Os ultrassons são ondas mecânicas com frequências maiores que 20 kHz. Ultrassons não são percebidos pelos humanos, uma vez que a frequência é maior que a dos sons audíveis, com frequência entre 20 Hz e 20 kHz. Ultrassons com frequência superior a 2 MHz apresentam normalmente ondas com baixa amplitude e são usualmente empregados, por exemplo, na produção de imagens para diagnóstico clínico. As ondas ultrassônicas com frequências mais baixas, próximas a 20 kHz, podem apresentar amplitude mais elevada (*i.e.* alta potência) que as de alta frequência e, justamente por este motivo, podem provocar transformações nos meios submetidos à insonação.

A sonicação de um líquido com ondas acústicas de frequência entre 20 e 1000 kHz leva à agitação e ao aquecimento do meio, bem como pode ocorrer a cavitação acústica.¹ Esse fenômeno envolve a nucleação, o crescimento e o colapso de microbolhas em líquidos. A cavitação tem início na fase de rarefação das ondas acústicas, quando moléculas de gases e vapores presentes no líquido são direcionadas para o interior dos núcleos produzidos pela disrupção do meio (*i.e.* formação de microbolhas) devido às abruptas mudanças de pressão ocorridas quando uma onda acústica passa da fase de rarefação (*i.e.* pressão negativa) para a de compressão (*i.e.* pressão positiva). A microbolha não irá extinguir na etapa de compressão da onda acústica subsequente a aquela que levou à formação da cavidade, uma vez que, devido ao período da ordem de algumas dezenas de microssegundos, apenas poucas moléculas dos gases contidos na bolha serão expulsas de seu interior ao serem direcionadas para o meio líquido. Nos ciclos subsequentes de rarefação, as dimensões da microbolha aumentarão. Isso ocorrerá até que a microbolha atinja seu diâmetro crítico, de aproximadamente 170 μm em água pura a 20 kHz e, nessa condição, ela irá colapsar, implodindo no próximo ciclo de compressão, como mostrado na Figura 6.1.

O colapso das microbolhas de cavitação durante a irradiação de um líquido num campo ultrassônico de alta potência acarreta em significativas perturbações no meio por onde as ondas se propagam. Essas perturbações resultam em aumento brusco de temperatura e pressão nos pontos onde houveram os colapsos das bolhas (*hot-spots*), bem como na produção de microjatos. Esses jatos, os quais atingem

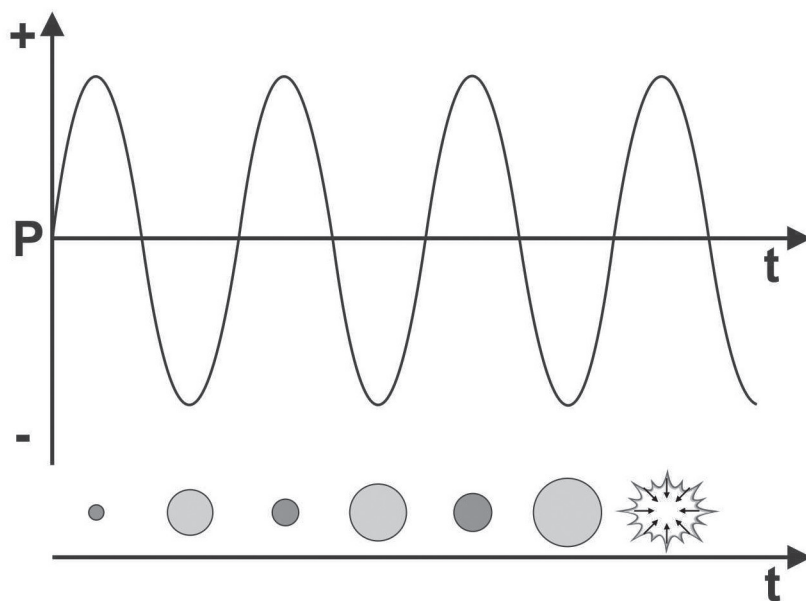


Figura 6.1. A cavitação acústica e sua relação com os ciclos de rarefação e compressão da onda ultrassônica.

velocidades da ordem de algumas centenas de metros por segundo, causam a erosão de sólidos presentes no meio líquido, inclusive da parede interna dos recipientes, sendo que a extensão da erosão depende da composição de cada material. Os ultrassons de alta potência levam também à destabilização das interfaces líquido-gás, líquido-líquido e sólido-líquido. Os efeitos químicos provocados pelo ultrassom estão intimamente associados à migração de moléculas para as bolhas de cavitação e às elevadas temperaturas e pressões alcançadas no momento do colapso dessas microbolhas.^{2,3} De acordo com Suslick *et al.*,⁴ o colapso das microbolhas produzidas pelo efeito do ultrassom resulta em temperaturas instantâneas da ordem de 5200 K na fase gasosa e 1900 K na interface gás/líquido, com taxa de aquecimento e resfriamento da ordem de 10^{10} Ks^{-1} . Outro fato que surpreende é a elevada pressão pontual que atinge valores da ordem de 1000 atm no momento do colapso. Assim, pode ser admitido que cada bolha de cavitação tenha o comportamento de um reator de dimensões micrométricas, gerando, no momento subsequente ao colapso implosivo, microjatos de até 400 m s^{-1} , além do rompimento de ligações químicas em algumas moléculas presentes no interior da bolha. O rompimento homolítico das ligações químicas gera radicais livres (*e.g.* $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{O}_2\text{H}$) no meio irradiado. A instabilidade dos radicais livres formados e o aumento da entropia provocado pela

agitação, cavitação acústica e pelos microjatos justificam o aumento na reatividade química de diferentes espécies expostas ao campo ultrassônico.⁵⁻⁷

Os ultrassons são gerados por transdutores piezoelétricos ou magnetoestrictivos, sendo que as configurações mais comuns são aquelas baseadas em elementos piezoelétricos. Estes transdutores, ao serem submetidos a um campo elétrico, sofrem deformações eletroelastomecânicas, resultando na produção de ondas ultrassônicas. Vários materiais, como turmalina, quartzo, topázio e o sal de Rochelle (tartarato de sódio e potássio tetraidratado), apresentam propriedades piezoelétricas. O titanato de bário (BaTiO_3) é uma cerâmica sintética muito empregada na fabricação de dispositivos emissores de ultrassons. Outros materiais cerâmicos sintéticos também podem ser empregados como transdutores. Entre eles se destacam o titanato de chumbo (PbTiO_3) e o titanato zirconato de chumbo ($\text{Pb}[\text{Ti}_x\text{Zr}_{1-x}]\text{O}_3$), também conhecido como PZT. O PZT é a cerâmica mais largamente empregada para a construção de diversos dispositivos baseados em propriedades piezoelétricas. Em geral, nos dispositivos geradores de ondas ultrassônicas, o material cerâmico está posicionado entre duas armaduras metálicas para a amplificação dos sinais e a frequência da onda acústica gerada é inversamente proporcional à espessura do elemento transdutor. Portanto, selecionado o elemento piezoelétrico no dispositivo emissor de ultrassons, a frequência de ressonância estará definida. Além da frequência da onda, a intensidade da energia acústica (Wcm^{-2}) é outra característica importante dos ultrassons; sendo a intensidade acústica proporcional ao quadrado da amplitude da vibração.¹

O banho e o homogeneizador ultrassônico são equipamentos habitualmente encontrados em laboratórios de análises químicas e bioquímicas. O banho ultrassônico é frequentemente empregado para a limpeza de vidrarias, circuitos impressos e para a desinfecção de materiais cirúrgicos e odontológicos. Por outro lado, o rompimento de paredes celulares é a aplicação mais difundida para os homogeneizadores ultrassônicos, também conhecidos como disruptores de células. Esquemas para um banho (A) e um homogeneizador (B) ultrassônicos são apresentados na Figura 6.2. Vale ressaltar que, nesses equipamentos, os geradores de ultrassons somente devem ser ativados caso seja garantido o contato direto entre o elemento de propagação das ondas ultrassônicas e um líquido. É importante que não haja segmentação por nenhuma bolha de gás entre o líquido e o metal (*e.g.* alumínio, aço e liga de titânio) responsável pela propagação das ondas. Esse cuidado é justi-

ficado pelo aumento significativo da resistência à propagação das ondas acústicas nos gases, quando comparado com meios líquidos ou sólidos. Isso é explicado pelo fato da velocidade de propagação do som ser máxima nos sólidos, mas diminuir significativamente nos líquidos e gases. Cabe destacar que as ondas acústicas, assim como quaisquer ondas mecânicas, não se propagam no vácuo.

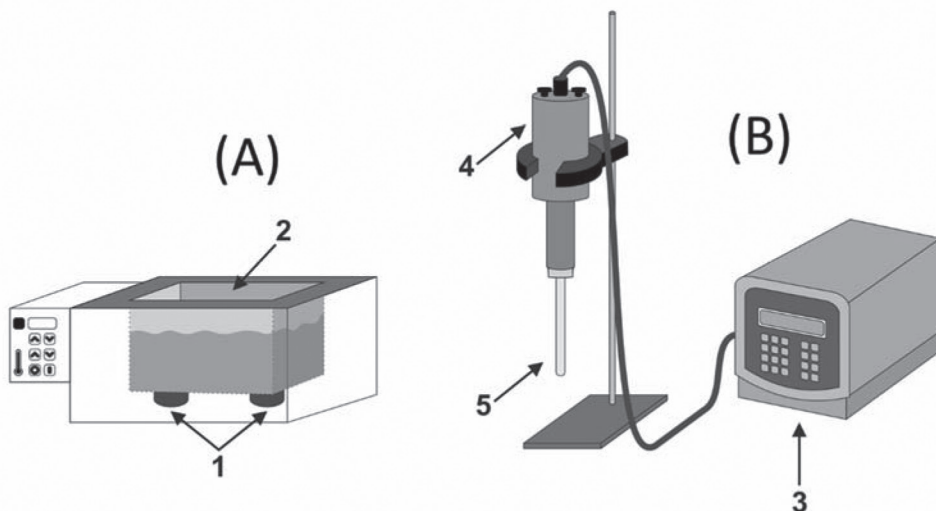


Figura 6.2. Esquema de dispositivos para aproveitamento de ondas ultrassônicas empregados em laboratórios. (A) Banho de ultrassom. (B) Homogeneizador ultrassônico (disruptor de células). 1. piezocerâmicas; 2. tanque; 3. gerador; 4. transdutor; 5. Transmissor (*probe*).

Em geral, nos banhos ultrassônicos, as piezocerâmicas estão posicionadas na parte externa do fundo do tanque metálico, de modo a evitar o contato direto entre o elemento transdutor e o líquido inserido no tanque. Esse posicionamento minimiza as perdas de energia, bem como os riscos de erosão do transdutor, caso este estivesse em contato com um líquido. Entretanto, alguns fabricantes desenvolveram banhos nos quais o transdutor é imerso no tanque junto com o líquido. Nessa condição as bolhas de cavitação surgirão na vizinhança do elemento gerador do ultrassom, resultando em aquecimento localizado.

Os banhos ultrassônicos de baixa intensidade equipados com modernos transdutores piezoelétricos têm, em geral, intensidades entre 1 e 2 $W\ cm^{-2}$. De acordo com Mason e Lorimer,¹ a determinação da intensidade ultrassônica em um dado ponto da solução não é uma tarefa simples e, geralmente, é apenas executada por métodos calorimétricos. Esses autores sugeriram a execução de um teste simples, que é realizado com uma folha de papel de alumínio posicionada no interior do

banho ultrassônico com água e detergente e sonicação por 30 s. Caso o banho seja apropriado, nesses 30 s a folha de alumínio deverá ser perfurada devido à cavitação acústica. A região do papel de alumínio onde for observado o maior número de perfurações será aquela onde a intensidade dos ultrassons será maior, e os frascos de reação deverão ser posicionados nessa região.

6.2. ULTRASSONS NA AMOSTRAGEM DE SUSPENSÕES

A sonicação de misturas sólido-líquido resulta na formação de bolhas de cavitação nas vizinhanças do sólido, podendo levar à (i) desagregação do material, pela ação de microjatos; (ii) aumento da reatividade pela geração de radicais livres; (iii) diminuição do gradiente de concentração nas proximidades do material sólido, pela produção de microfluxo de matéria e/ou (iv) fusão do sólido, devido às temperaturas extremamente elevadas atingidas no momento do colapso das bolhas de cavitação.⁸ A presença de sólidos no meio leva, também, à deformação das bolhas de cavitação. Esse efeito é relacionado à intensificação da produção das bolhas de cavitação na vizinhança do sólido e pode ser explicado, por exemplo, (i) pela perda da uniformidade na distribuição de moléculas de gases dissolvidos nas proximidades do sólido e (ii) por possíveis interações de reflexão das ondas acústicas com as partículas sólidas. As bolhas de cavitação em um líquido sonicado assumem elevado grau de esfericidade e, no momento do colapso, os microjatos ocorrerem em todas as direções. Contudo, nos sistemas contendo partículas sólidas em suspensão, a nova geometria das bolhas de cavitação, em forma de coração, faz com que, no momento do colapso, os microjatos sejam preferencialmente direcionados para o sólido. Isso garante a agitação, apesar de haver certo comprometimento nos microfluxos de matéria durante as etapas de nucleação e crescimento das bolhas de cavitação, visto que as moléculas de gás que penetrarem nas cavidades serão preponderantemente oriundas da vizinhança da bolha que está mais distante do material particulado.

Nos procedimentos de amostragem de suspensões com agitação ultrassônica é comum que uma fração significativa do analito seja extraída para a fase líquida, melhorando, em alguns casos, a precisão e a exatidão. Com base nestas observações, muitos autores propuseram estudos mais detalhados sobre os efeitos

do ultrassom no preparo de suspensões e vários trabalhos têm explorado a extração dos analitos para o meio líquido pela ação dos ultrassons, seguida da amostragem apenas do sobrenadante para determinação.⁹ Ao se comparar com a amostragem de suspensões, a extração de um analito do material em suspensão para a fase líquida apresenta uma série de vantagens, como:

- (i) Pode-se prescindir da adição de agentes surfactantes no sistema, uma vez que os erros relacionados às diferenças nas taxas de sedimentação deixarão de ser importantes;
- (ii) A massa representativa será proporcional àquela utilizada para o preparo das suspensões (*e.g.* 50 – 1000 mg) e, conseqüentemente, esperar-se-á maior confiabilidade nos resultados obtidos quando comparados com a análise de suspensões ou a amostragem direta de sólidos a partir de materiais heterogêneos;
- (iii) Serão evitados erros associados a distribuições não uniformes do tamanho das partículas;
- (iv) Etapas de diluição poderão ser executadas com um amostrador automático;
- (v) Efeitos de matriz serão minimizados, uma vez que apenas a fração extratorra líquida será introduzida no atomizador.
- (vi) A ação dos modificadores químicos será significativamente melhorada nas determinações por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, uma vez que o modificador irá interagir melhor com o analito em solução, quando comparado com a interação com analito ocluso nas partículas;
- (vii) Há a possibilidade de obter melhores resultados no uso de soluções de referência para a construção de curvas analíticas de calibração;
- (viii) Baixo consumo de soluções ácidas (permite o uso de soluções diluídas de HNO₃ e/ou HCl);
- (ix) Maior tolerância quanto ao tamanho das partículas, quando comparado à amostragem de suspensões na introdução da amostra em nebulizadores (*e.g.* ICP OES e ICP-MS);
- (x) Possibilidade de aplicação do princípio do frasco único para a minimização dos riscos de contaminação, se a amostra for preparada diretamente nos frascos do amostrador automático ou em tubos volumétricos de centrífuga;

- (xi) Aumento da segurança do operador, em comparação aos procedimentos de decomposição da amostra via úmida a quente ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$), uma vez que os métodos de extração ultrassônica serão geralmente conduzidos à temperatura ambiente.

Entretanto, na literatura também são apresentadas uma série de limitações para os métodos de extração assistidos por ultrassons. Entre essas, deve-se destacar que (i) geralmente, a massa tomada da alíquota é menor que aquela utilizada nos procedimentos de digestão em sistemas abertos e, para a maioria dos casos, existe um compromisso entre a capacidade do frasco utilizado para as extrações, a composição da solução extratora e o tempo de sonicação; (ii) o tamanho das partículas pode ser crítico e deve ser cuidadosamente avaliado; (iii) a robustez dos métodos de extração executados com banhos ultrassônicos é questionável, uma vez que a distribuição da intensidade ultrassônica no interior da cavidade do banho não é homogênea e pode variar de acordo com a quantidade de líquido contido na cavidade, com o material dos frascos, com o número de frascos expostos simultaneamente à irradiação e com a posição do transdutor ultrassônico e (iv) embora o tempo de extração seja curto, geralmente inferior a 20 min, a frequência analítica é drasticamente limitada ao número de frascos que podem ser inseridos simultaneamente na cavidade do banho sem que haja prejuízo para a distribuição da energia acústica.

Frente às vantagens e limitações inerentes a qualquer procedimento analítico, inicialmente, é possível inferir que a extração ultrassônica apresenta potencialidades e surge como uma alternativa aos procedimentos convencionais utilizados no preparo de amostras para espectrometria atômica. A amostragem de suspensões foi tratada mais detalhadamente no Capítulo 5.

6.3. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ONDAS ULTRASSÔNICAS

Nos últimos anos um bom número de métodos de preparo de amostras em espectrometria atômica utilizando ultrassom foi publicado. Contudo, a quantidade de métodos de extração assistida por ultrassom se mantém inexpressiva quando comparada ao número de métodos de decomposição assistida por radiação micro-ondas.¹⁰ As extrações assistidas por ultrassom de alguns elementos, como cádmio,

chumbo, cobre e manganês têm sido mais reportadas na literatura. Por outro lado, informações sobre a extração de elementos como antimônio, bário, bismuto, molibdênio, entre outros, ainda são incipientes.

Embora a aplicação do ultrassom visando à indução de reações químicas (sonoquímica) pareça uma tarefa simples, são necessários conhecimentos de fundamentos desta fonte de energia, bem como dos principais fatores físicos que podem influenciar os processos sonoquímicos. Aspectos relevantes sobre a teoria da aplicação do ultrassom com ênfase extensiva nos efeitos químicos e físicos, assim como nos cálculos matemáticos pertinentes aos fenômenos de cavitação acústica, são abordados em diferentes publicações.¹¹⁻¹⁶

De acordo com Capelo *et al.*,⁹ os resultados mais contraditórios reportados na literatura sobre o uso da extração ultrassônica no preparo de amostras estão relacionados a procedimentos que empregam banhos ultrassônicos. Geralmente, a potência e a dissipação da energia desses equipamentos variam fortemente com a frequência, configuração e posição dos transdutores piezoelétricos, assim como com o volume da cuba do banho. A dificuldade é que essas características também variam com o fabricante, sendo difícil comparar os resultados obtidos com diferentes banhos ultrassônicos. Nesses equipamentos, a energia ultrassônica é transmitida de forma indireta para os frascos de reação. Assim, a potência e o perfil de distribuição da energia ultrassônica podem proporcionar resultados contraditórios quanto à reprodutibilidade de resultados analíticos obtidos em diferentes laboratórios. Como exemplo, Santos *et al.* encontraram diferentes percentuais de extração de arsênio em alimentos marinhos,¹⁷ até mesmo quando empregaram um único banho ultrassônico.

Como os ultrassons têm que atravessar as paredes do frasco de reação para atingir o sistema em investigação, e parte da energia é absorvida e/ou refletida pelas paredes do frasco que contém a amostra e a solução reagente, a energia acústica excedente que deverá induzir a cavitação no interior do frasco é significativamente menor que no interior da cuba e logo acima do transdutor. Assim, especial atenção deve ser dada às características dos frascos de reação como material, geometria, espessura da parede, integridade física (ranhuras), velocidade do som no material e coeficiente de atenuação do material. Por outro lado, a transmissão indireta de energia para os frascos proporciona menor possibilidade de contaminação, visto que não há contato direto das amostras com o meio líquido do banho, nem com

peças metálicas. Ressalta-se também, a possibilidade de sonicação concomitante de mais de uma amostra, mas o perfil de distribuição da energia ultrassônica no interior do banho com diferentes quantidades de frascos de reação deve ser cuidadosamente avaliado pelo operador. Nesse sentido, especial atenção deve ser dada às características técnicas do equipamento, assim como aos frascos de reação, no desenvolvimento de procedimentos analíticos que façam uso de banhos ultrassônicos.

Outro dispositivo comumente utilizado para extração sólido-líquido é o homogeneizador ultrassônico. Nesse tipo de equipamento, o transdutor é acoplado a uma sonda de titânio ou liga de titânio (*e.g.* Ti-6AL-4V), a qual é inserida diretamente no meio contendo o líquido e as partículas sólidas em suspensão. Geralmente, esse dispositivo proporciona, ao meio de extração, amplitudes de onda muito maiores que aquelas associadas aos banhos ultrassônicos (*e.g.* 1 a 5 W cm⁻² em banho de ultrassom contra 50 a 200 W cm⁻² com os homogeneizadores, tipicamente operados a 20 kHz). Essas ondas são dissipadas diretamente na suspensão e alguns autores têm destacado sua eficiência também para redução do tamanho das partículas,^{17,18} redução do tempo, bem como melhoria da eficiência de extração.⁹ Entretanto, a inserção do transmissor do homogeneizador diretamente na suspensão pode representar uma fonte de contaminação da amostra por elementos presentes na sonda. Na Tabela 6.1 são apresentadas as principais características de banhos e homogeneizadores ultrassônicos e os valores médios frequentemente reportados para equipamentos de uso laboratorial. Ressalta-se que banhos e homogeneizadores

Tabela 6.1. Características dos banhos e homogeneizadores ultrassônicos empregados para o preparo de amostras em procedimentos analíticos.

	Banho	Homogeneizador
Intensidade (W cm ⁻²)	1 – 5	50 – 200
Amplitude variável*	Sim	Sim
Aplicação direta na amostra	Não	Sim
Custo	< US\$ 1000	US\$ 2000 - 4500
Solução extratora	HNO ₃ / HCl (< 3 mol L ⁻¹)	HNO ₃ (< 1,4 mol L ⁻¹)
Frequência analítica	Baixa (1 - 6 amostras / 20 min) ^a	Baixa (1 amostra / 5 min) ^b

*A intensidade depende da amplitude do deslocamento imposto pelo elemento transdutor, o qual depende da frequência e da potência nominal aplicada. ^aBanhos com maior capacidade podem ter a frequência analítica aumentada. Porém, a distribuição dos ultrassons na cuba deve ser avaliada. ^bAlguns fabricantes oferecem equipamentos com múltiplas sondas de transmissão, que podem ser empregadas para aumentar a frequência de amostragem.

ultrassônicos com níveis mais elevados de potência acústica são comercialmente disponíveis.

Na Tabela 6.2 estão apresentadas as características de alguns métodos que empregaram extrações assistidas por ultrassom visando determinações por técnicas de espectrometria atômica. O percentual de extração foi determinado a partir da concentração da espécie de interesse em materiais de referência certificados ou pela comparação com os valores obtidos após a decomposição ácida das amostras. Em alguns casos, o percentual de extração foi comparado à fração correspondente de cada analito em métodos de extração sequencial. Ao considerar as informações da Tabela 6.2 observa-se que o emprego de sondas ultrassônicas proporciona menores intervalos de tempo e maiores eficiências de extração que os métodos que fazem uso dos banhos de ultrassom.

Entretanto, alguns resultados divergentes sobre a extração ultrassônica também foram publicados, principalmente com o uso de banhos de ultrassom nos procedimentos de extração de alguns elementos de diferentes tipos de amostras. Entre alguns exemplos, Mierzwa *et al.* não obtiveram recuperações quantitativas para selênio em amostras de fígado bovino,¹⁹ aplicando extração em banho ultrassônico a 70 °C por 18 min. Em contrapartida, Bermejo-Barrera *et al.* obtiveram recuperações quantitativas para o mesmo elemento em amostras de cabelo utilizando um banho ultrassônico a 90 °C por apenas 10 min.²⁰ Essa diferença pode ser justificada pela condição da amostra na extração, tipo de ácido, pela forma em que o selênio está associado às diferentes matrizes, pelas condições aplicadas na extração.

Outras conclusões divergentes foram observadas nos resultados de extrações ácidas de amostras biológicas realizadas em banhos de ultrassom. El Azouzi *et al.* utilizaram uma solução contendo 1,6 mol L⁻¹ HNO₃, 2 mol L⁻¹ HCl e 0,1 mol L⁻¹ H₂O₂ para extração ultrassônica de metais em amostras de mexilhão.²¹ Esses autores obtiveram recuperações quantitativas de Cd (95%) e Cu (100%), somente após 120 min de sonicação. Contudo, mesmo após esse tempo, a extração de cromo foi parcial (54%). Enquanto isso, Minami *et al.*, empregaram banhos de ultrassom e solução 1 mol L⁻¹ de HNO₃, e reportaram extrações quantitativas de Cd, Cu, Mn e Pb em diferentes materiais biológicos de origem animal e vegetal após 5 min de sonicação.²² Apesar de nos dois estudos as matrizes serem biológicas (tecido animal), os relatos não esclarecem os motivos de um dos

grupos atingir recuperações quantitativas para Cd e Cu após 120 min de sonicação em meio extrator mais agressivo (HNO_3 , HCl e H_2O_2),²¹ enquanto o outro grupo atingiu eficiência equivalente com apenas 5 min de sonicação em meio de HNO_3 1 mol L^{-1} .²² Em estudos realizados também com tecidos de animais marinhos, Bermejo-Barrera *et al.* propuseram a extração de As, Ca, Cd, Co, Cr, Mn, Pb, Se, Zn, Ca, Fe, Hg e Mg empregando banhos ultrassônicos.²³ De acordo com os autores, para intervalos de tempo de sonicação entre 10 e 120 min não foram observados efeitos significativos na recuperação das espécies de interesse; exceção feita ao selênio, para o qual foram necessários 30 min de sonicação a $90 \text{ }^\circ\text{C}$. A concentração de ácidos na mistura extratora foi otimizada para cada analito. Foram usadas soluções extradoras contendo entre 0,5 e $4,5 \text{ mol L}^{-1}$ HNO_3 , associadas, ou não, ao HCl entre 0,5 e $4,5 \text{ mol L}^{-1}$. Ao considerar as conclusões desses três estudos realizados com amostras similares, fica evidente a dificuldade em estabelecer um método de preparo de amostras de tecido de animais marinhos assistida por ultrassons que possa ser reproduzida em qualquer laboratório. Certamente, há outros parâmetros críticos fortemente relacionados com a extração ultrassônica, que não foram convenientemente detalhados nesses estudos, tais como a potência acústica efetiva, os tipos de frascos e suas características como o formato, composição química, capacidade, espessura das paredes, ocorrência de ranhuras ou microfaturas, além de parâmetros como a rigidez e a capacidade de atenuação dos ultrassons. Esses parâmetros afetam também os brancos analíticos produzidos nesses frascos submetidos ao campo ultrassônico, devido ao risco de lixiviação de espécies das paredes internas dos recipientes empregados para as extrações.

A obtenção de brancos analíticos para procedimentos de extração, conduzidos sob a ação de ultrassons em banho ou homogeneizadores tipo sonda, é uma tarefa que merece atenção, uma vez que as bolhas de cavitação e os microjatos se comportam diferentemente na presença ou ausência de partículas sólidas no meio.²⁴ Assim, se o branco analítico é habitualmente entendido como uma solução preparada que não contém a amostra e que passa por todas as etapas do processamento que a amostra também foi submetida, como poderá ser garantido que o branco seja fiel se o comportamento dos ultrassons com sólidos em suspensão é diferente daquele dos ultrassons em soluções? Esse é um importante desafio para a validação dos métodos de preparo de amostras assistidos por ultrassons.

Tabela 6.2. Trabalhos que empregam extração assistida por ultrassom na determinação elementar por espectrometria atômica.

Amostra	Analitos (% de recuperação)	Dispositivo (tempo)	Solução extratora (técnica analítica)	Ref.
Fígado bovino e crustáceo	Se (85 – 88%)	Banho (18 min)	4% v v ⁻¹ HNO ₃ (GFAAS)	18
Cabelo	Cd, Cr, Pb, Se (> 90%), Me-Hg (> 90%)	Banho (10 min)	4,8 mol L ⁻¹ HNO ₃ + 4,8 mol L ⁻¹ HCl + 0,5 mol L ⁻¹ H ₂ O ₂ (GFAAS) 0,5 mol L ⁻¹ HNO ₃ + 4,8 mol L ⁻¹ HCl + 0,5 mol L ⁻¹ H ₂ O ₂ (CVAAS)	19
Mexilhão	Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, V, Zn (> 90%)	Banho (120 min)	1,6 mol L ⁻¹ HNO ₃ + 1,2 mol L ⁻¹ HCl + 0,1 mol L ⁻¹ H ₂ O ₂ (FAAS e GFAAS)	20
Tecido animal e vegetal	Cd, Cu, Mn, Pb (≈ 100%)	Banho (5 min)	0,5 mol L ⁻¹ HNO ₃ (GFAAS e MIP-MS)	21
Tecido animal marinho	As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Pb, Se, Zn (85 - 105%)	Banho (10 - 30 min)	0,5 - 4,5 mol L ⁻¹ HNO ₃ , 2,0 - 4,0 mol L ⁻¹ HCl, 1,5 mol L ⁻¹ H ₂ O ₂ (GFAAS, FAAS e CVAAS)	22
Tecido animal e vegetal, sedimentos	Cd, Cu, Pb (> 96%), Cd (97%), Cu (60%), Pb (54%)	Sonda (2 - 5 min)	0,5 a 5,0% (v v ⁻¹) HNO ₃ (GFAAS)	23
Material biológico e sedimentos	Cd (> 96%), Cd (> 75%)	Sonda (1 min)	3% v v ⁻¹ HNO ₃ (GFAAS)	24
Sedimento	Cd (74%), Cr (38%), Ni (67%), Pb (58%), Zn (62%), Cu (62%), Al (53%), As (65%), Co (60%), Fe(24%), Mg (78%), Mn (79%)	Banho (20 - 30 min)	Extração sequencial BCR (ICP OES)	25
Solos e sedimentos	Fe, Mn, Zn (84 – 98%) Cu (74%)	Sonda (10 min) Banho (180 min)	Extração sequencial BCR (FAAS e ICP OES)	26
Alga marinha	As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mn, Mg, Na, Ni, Zn (~100%), Al (48%), Ba (70%), Pb (93%), V (80%), Cr (34 - 100%)	Banho (10 + 35 min)	6,0 mol L ⁻¹ HCl (etapa 1) e 3,7 mol L ⁻¹ HNO ₃ + 3,0 mol L ⁻¹ HCl + 3,0 mol L ⁻¹ H ₂ O ₂ (etapa 2) / (ICP OES)	27
Vegetais	Ca, Mg, Mn, Zn / (96 – 102%), Fe (98%, repolho)	Banho (10 min)	0,14 ou 1,4 mol L ⁻¹ HNO ₃ (FAAS)	28
Carne	Zn (~ 100%)	Banho (0,5 min)	0,75 mol L ⁻¹ HNO ₃ + 0,75 mol L ⁻¹ HCl (FAAS)	29

Tabela 6.2. Trabalhos que empregam extração assistida por ultrassom na determinação elementar por espectrometria atômica. (cont.)

Tecido animal, tecido vegetal e cinzas	Hg e CH ₃ -Hg (~ 100%)	Sonda (10 min)	5% v v ⁻¹ HNO ₃ - 0,02% v v ⁻¹ tiourea, 10% v v ⁻¹ HNO ₃ - 0,02% tiourea, 20% v v ⁻¹ HNO ₃ - 0,2% v v ⁻¹ tiourea (CVAAS)	30
Sedimento	As(III), As(V), monometilarsênio e dimetilarsênio (~ 100%)	Sonda (1 min)	Especiação em tampão fosfato (pH 5,5 - 5,6) (HPLC-AFS)	31
Mexilhão	Cd, Pb (~ 100%)	Banho (2-3 min)	3 mol L ⁻¹ HNO ₃ (FAAS)	32
Músculo de peixe	Ca, Cu, Fe, Mg, Zn (~ 100%)	Banho (25 min)	30% v v ⁻¹ H ₂ O ₂ - 5% v v ⁻¹ CFA-C (ICP OES)	33
Solos	Ge (~ 100%)	Sonda (10 min)	12 mol L ⁻¹ HCl (GFAAS)	34
Tecido animal	Se (93 - 102%)	Sonda (2 min)	Especiação (ICP-MS)	35
Mexilhão, peixe e plantas	Cu (93 - 103%)	Sonda (3 min)	3% v v ⁻¹ HNO ₃ (GFAAS)	36
Cabelo	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn (> 93%)	Banho (10 min)	4 mol L ⁻¹ HNO ₃ + 3,5 mol L ⁻¹ HCl (FAAS e GFAAS)	37
Lama, cinza e crustáceo	Cd (89 - 102%), Cd (29%)	Banho (20 min)	6 mol L ⁻¹ HCl (FI-CV-AAS)	38
Cabelo				
Alimentos marinhos	As (> 94%)	Sonda (3 min) Banho (30 min)	3% v v ⁻¹ HNO ₃ (GFAAS)	39
Mexilhão	CH ₃ -Hg, Hg (> 92%)	Sonda (5 min)	CH ₃ -Hg - 2 mol L ⁻¹ HCl, Hg - 5 mol L ⁻¹ HCl (CVAAS)	40
Vegetais	Mg, Mn, Zn (~ 100%)	Sonda (3 min)	0,3% v v ⁻¹ HNO ₃ (FAAS)	41
Lama de esgoto	Cr, Cu, Ni, Pb, Zn (> 96%)	Sonda (22 min)	Extração sequencial BCR (FAAS)	42
Material biológico e sedimentos	As (8 - 111%)	Sonda (20 min)	15% v v ⁻¹ HCl (FI-HGAAS)	43

As discordâncias nos resultados podem também ser observadas nos experimentos executados com homogeneizadores. Por exemplo, Lima *et al.* obtiveram recuperações quantitativas para Cd em CRMs de materiais biológicos e sedimentos empregando extrações com sonda ultrassônica de 50 W por 2 min,²⁵ enquanto no estudo conduzido por Capelo e colaboradores foram observadas extrações quantitativas para Cd em materiais biológicos com tamanho de partículas < 50 µm, com sonda de 100 W por 1 min de irradiação.²⁶ No estudo conduzido por Capelo, não foram obtidas recuperações quantitativas para Cd no mesmo tipo de CRM

de sedimento utilizado por Lima *et al.* (*i.e.* CRM 320 *River Sediment*), mesmo aumentando o intervalo de tempo.²⁵ Nos casos das extrações conduzidas com os homogeneizadores, alguns parâmetros importantes podem ser considerados. Entre esses, destaca-se a posição da ponta da sonda em relação ao fundo do frasco, porque, como qualquer onda, as ondas mecânicas sofrem interferências construtivas e destrutivas. Assim, para que a ação do ultrassom seja maximizada, é aconselhável que a distância entre o extremo inferior da sonda e o fundo do recipiente seja um múltiplo inteiro da metade do comprimento de onda da radiação ultrassônica. Certamente, o efeito provocado pelo posicionamento inadequado da sonda dependerá do tipo de frasco e rigidez do material, uma vez que a onda deverá ser refletida.

Uma terceira alternativa de sistema para sonicação denominado *cup-horn* é baseada nos mesmos homogeneizadores ultrassônicos, mas com a substituição da sonda por dispositivos que permitem a irradiação indireta da amostra, *i.e.*, sem o contato com a sonda. Com esse dispositivo, o risco de contaminação pela erosão da superfície da sonda é eliminado.

O grupo de pesquisa da Universidade de Vigo, liderado por Bendicho e Lavilla, vem explorando as extrações empregando homogeneizadores equipados com *cup-horn* para o preparo das amostras. Entre os diferentes artigos publicados destaca-se a investigação de De la Calle *et al.* que obtiveram recuperação quantitativa para Sb, mas não para cobalto (~ 72%) em amostras de sedimentos.²⁷ No Brasil, Teixeira e colaboradores desenvolveram procedimentos de extração utilizando *cup-horn*. Os autores relataram grande eficiência na extração de elementos-traço em amostras de fertilizantes orgânicos em condições não severas de extração no tocante ao volume de reagentes e temperatura. O referido processo levou a um aumento na produtividade analítica, com cerca de 32 extrações por hora, com recuperações entre 80 e 117%. Esses resultados estão em concordância com os valores preconizados como aceitáveis para esse tipo de amostra por agências reguladoras internacionais.²⁸

Canepari *et al.* compararam as extrações sequenciais assistidas por micro-ondas e ultrassom para as determinações de Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, Al, As, Co, Fe, Mg e Mn em sedimentos.²⁹ A extração assistida por ultrassom apresentou baixas recuperações para todos os elementos (*e.g.* Fe < 24%, Mg < 78%, Zn < 62%, Cu < 62%). Além disso, os autores ressaltaram que o método assistido por ultrassom foi pouco reprodutível, até mesmo quando comparado com agitação mecânica. Por sua vez, Davidson e Delevoye reportaram valores concordantes entre as taxas de

extração sequencial empregando técnica convencional e com o auxílio de ultrassom para as determinações de Fe, Mg e Zn em solos e sedimentos (de 84 a 98%).³⁰ Nesse estudo, também foram reportados baixos níveis de extração de Cu (74%) e o desempenho do método assistido por ultrassom foi deficiente para extração de alguns dos analitos em sedimentos marinhos, sendo que a eficiência para diferentes espécies variou entre 58 e 104%. Segundo esses autores, os coeficientes de variação observados para essas amostras evidenciam as dificuldades do desenvolvimento de métodos de extração sequencial assistidos por ultrassom para aplicação em amostras diversas.

Domínguez-González *et al.* empregaram preparo de amostra assistido por ultrassom para avaliar os teores de Al, As, Ba, Fe, V, Ca, K, Na, Mg, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em algas marinhas.³¹ Foram necessários 10 min de sonicação em meio 6 mol L⁻¹ HCl a 65 °C para o rompimento das paredes celulares das algas, permitindo melhores recuperações de elementos, como Al, As, Fe, Ba e V. Após essa etapa, foram necessários mais 35 min de sonicação a 65 °C em meio 3,7 mol L⁻¹ HNO₃ + 3,0 mol L⁻¹ HCl + 3,0 mol L⁻¹ H₂O₂ para a extração dos demais analitos. Nesse estudo, foram obtidas recuperações quantitativas para Fe (93 a 97%) em CRMs, mesmo se tratando de um elemento de difícil extração com ultrassom. Em outra investigação, Nascentes *et al.* demonstraram que 10 min de sonicação foram suficientes para a extração quantitativa de Ca, Mg, Mn e Zn com 0,14 mol L⁻¹ HNO₃ em diferentes amostras de tecido vegetal.³²

Os muitos resultados apresentados na literatura permitem inferir que as ondas mecânicas geradas por processadores ultrassônicos promovem a extração de analitos importantes na análise de materiais biológicos, solos e sedimentos. Neste sentido, a extração assistida por ultrassom pode ser recomendada como um método de *screening*, configurando-se como uma alternativa rápida e de baixo custo para o preparo de amostras visando, principalmente, ao monitoramento dos teores de Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Pb e Zn em vegetais; de As, Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Se e Zn em tecidos animais e de As, Cd, Cu, Mn, Pb e Zn em solos e sedimentos.

Em geral, observa-se que a agitação ultrassônica diminui o tempo de extração e permite utilizar soluções ácidas mais diluídas, quando comparada aos métodos de agitação manual, mecânica, magnética, ou à agitação por efeito vortex, frequentemente utilizada nos laboratórios de análises químicas. Entretanto, a extração quantitativa depende fortemente da interação dos analitos com a matriz. Neste sentido, embora os métodos assistidos por ultrassom sejam promissores, é recomendável que

as variáveis que influenciam a extração dos analitos sejam empírica e rigorosamente avaliadas para diferentes tipos de amostras antes da utilização dessa estratégia.

Na Tabela 6.3 estão apresentadas as condições estabelecidas por Santos Jr. para a extração de diferentes elementos em amostras de tecido vegetal.⁴⁸ Os resultados apresentados servem como um ponto de partida para alcançar as condições ótimas para a determinação dos diferentes elementos avaliados em amostras de tecidos vegetais. Essa ressalva deve-se ao fato do período de tempo de sonicação e a concentração de ácidos poderem variar consideravelmente de amostra para amostra, bem como com o equipamento ultrassônico empregado. O mesmo autor estabeleceu também condições de partida para amostras de tecidos animais, além de solos e sedimentos.⁴⁸

Novos avanços têm sido observados para a extração de espécies metálicas assistida por ultrassons em diferentes matrizes, destacando-se a otimização multivariada das condições de extração dos analitos.⁴⁹⁻⁵⁶ Também são reportadas determinações de espécies metálicas por técnicas eletroanalíticas em procedimentos cujo preparo é assistido por ultrassons.⁵⁷⁻⁵⁹

6.4. DECOMPOSIÇÕES ASSISTIDAS POR ONDAS ULTRASSÔNICAS

As ondas ultrassônicas foram aplicadas inicialmente em métodos de análises de gases; na eletroquímica, para acelerar a deposição eletrolítica de íons metálicos presentes em solução e para a degaseificação de soluções. Além das aplicações destacadas neste capítulo, as ondas ultrassônicas também têm sido utilizadas para acelerar a dissolução de sólidos em solução ácida,⁶⁰ por vezes associada a sistemas de análises em fluxo.⁶¹ Um exemplo da ação das bolhas de cavitação em procedimentos de decomposição é a dissolução dos produtos de reação que são formados na decomposição de minério de ferro pela ação de ácido fosfórico.⁶⁰ Em misturas de solventes com ácido fluorídrico a ação das bolhas de cavitação minimiza a formação de filmes superficiais insolúveis na interface solvente-soluto e facilita a penetração do ácido para o interior do sólido. Este procedimento pode ser usado com sucesso, por exemplo, na determinação de K_2O e FeO em rochas e minérios, assim como de CaO e MgO em fragmentos de vidros. A ação das bolhas de cavitação pode acelerar a interação entre fluoretos e o ácido bórico. Atenção especial também foi dada para

Tabela 6.3. Condições experimentais estabelecidas para a maximização da extração de Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Pb e Zn em amostras de tecidos vegetais com homogeneizador de 50 W (Vibracell VC50, Sonics and Materials) e banho de 90 W (Aquasonic 75D, VWR Scientific).

Variáveis	Constituintes dos tecidos vegetais avaliados										
	Al	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Pb	Zn
Sonda											
HNO ₃ (mol L ⁻¹)	2,8	1,4	0,7	2,8	1,4	2,8	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
HCl (mol L ⁻¹)	2,4	-	-	2,4	-	2,4	-	-	1,2	-	-
Tempo (min)	20	10	5	20	10	10	10	5	10	5	5
Partícula (µm)	<62	<62	<212	<62	<212	<62	<62	<62	<62	<62	<62
Extração (%) *	18-85	80-95	93-105	41-91	96-102	75-102	83-98	89-105	90-102	93-101	94-102
CV (%) **	6-9	6-11	3-8	5-12	4-7	5-12	3-11	2-8	3-7	2-9	2-6
Banho	Al	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Pb	Zn
HNO ₃ (mol L ⁻¹)	2,8	1,4	1,4	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	1,4
HCl (mol L ⁻¹)	2,4	-	-	2,4	-	2,4	-	-	2,4	-	-
Tempo (min)	20	10	10	20	10	20	10	10	20	10	10
Partícula (µm)	<62	<62	<212	<62	<62	<62	<62	<62	<62	<62	<62
Extração (%) *	11-65	75-97	90-98	46-71	91-99	48-85	72-99	78-101	75-105	91-105	87-96
CV (%) **	4-9	3-7	4-10	7-19	2-9	6-15	4-7	2-11	5-14	5-7	1-4

* faixa de extração e ** coeficientes de variação para as diferentes amostras.

rápida decomposição de fosfato de cálcio e para liberação de pentóxido de fósforo de apatitas magmáticas ou apatitas sedimentares e de superfosfatos.⁶⁰

Alguns trabalhos utilizando ultrassom na etapa de digestão das amostras foram reportados na literatura⁶²⁻⁶⁵ e quatro revisões foram publicadas,⁶⁶⁻⁶⁹ destacando, entre outros temas, o emprego de ultrassom para o preparo de amostras. De todo modo, espera-se um avanço significativo no desenvolvimento de métodos assistidos por ultrassom para a próxima década.

REFERÊNCIAS

1. MASON, T. J.; LORIMER, J. P. **Applied sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 314 p.
2. SUSLICK, K. S. The chemical effects of ultrasound. **Scientific American**, 260, 80-86, 1989.
3. SUSLICK, K. S. Sonochemistry. **Science**, 247, 1439-1445, 1990.
4. SUSLICK, K. S.; DIDENKO, Y.; FANG, M. M.; HYEON, T.; KOLBECK, K. J.; MCNAMARA, W. B.; MDLELENI, M. M.; WONG, M. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A - Mathematical Physical and Engineering Sciences**, 357, 335-353, 1999.
5. CARVALHO, L. R. F.; SOUZA, S. R.; MARTINIS, B. S.; KORN, M. Monitoring of the ultrasonic irradiation effect on the extraction of airborne particulate matter by ion chromatography, **Analytica Chimica Acta**, 317, 171-179, 1995.
6. KORN, M.; BORGES, S. S.; MAIA, P. R. M.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. Reagent generation for chemical analysis assisted by ultrasonic irradiation. **Ultrasonics**, 42, 585-590, 2004.
7. KORN, M.; ANDRADE, M. V. A. S.; BORGES, S. S.; SOUSA, C. S.; OLIVEIRA, F. S. Reagent generation assisted by ultrasonic irradiation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 14, 254-258, 2003.
8. BLAKE, J. R. Acoustic cavitation and sonoluminescence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 357, 199-369, 1999.
9. CAPELO, J. L.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, 12, 225-232, 2005.
10. SMITH, F. E.; ARSENAULT, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, 43, 1207-1268, 1996.

11. YOUNG, F. R. **Cavitation**. Maidenhead: McGraw Hill, 1989. 416 p.
12. CHEN, D.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. **Handbook on Applications of Ultrasound: Sonochemistry for Sustainability**. Boca Raton: CRC Press, 2011. 739 p.
13. BLAKE, J. R.; BOULTON-STONE, J. M.; THOMAS, N. H. (Ed.) **Bubble dynamics and interface phenomena**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 516 p.
14. MARGULIS, M. A. **Sonochemistry and cavitation**. Luxembourg: Gordon and Breach Science Publishers, 1995. 500 p.
15. CRUM, L. A.; MASON, T. J.; REISSE, J. L.; SUSLICK, K. S. (Ed.) **Sonochemistry and sonoluminescence**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. 166 p.
16. MASON, T. J.; PETERS, D. **Practical Sonochemistry: Power Ultrasound Uses and Applications**. 2^a ed, Cambridge: Woodhead Publishing, 2002.
17. SANTOS, C.; ALAVA-MORENO, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Total As in seafood as determined by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry-longitudinal Zeeman background correction: An evaluation of automated ultrasonic slurry sampling, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15, 987-994, 2000.
18. WIBETOE, G.; TAKUWA, D.T.; LUND, W.; SAWULA, G. Coulter particle analysis used for studying the effect of sample treatment in slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 363, 46-54, 1999.
19. MIERZWA, J.; ADELOJU, S. B.; DHINDSA, H. S. Ultrasound accelerated solid-liquid extraction for the determination of selenium in biological samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. **Analytical Sciences**, 13, 189-193, 1997.
20. BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PINEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. Factorial designs for Cd, Cr, Hg, Pb and Se ultrasound-assisted acid leaching from human hair followed by atomic absorption spectrometric determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15, 121-130, 2000.
21. EL AZOUZI, H.; CERVERA, M. L.; DE LA GUARDIA, M. Multi-elemental analysis of mussel samples by atomic absorption spectrometry after room temperature sonication. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 13, 533-538, 1998.
22. MINAMI, H.; HONJYO, T.; ATSUYA, I. A new solid-liquid extraction sampling technique for direct determination of trace elements in biological materials by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, 51, 211-220, 1996.
23. BERMEJO-BARRERA, P.; MUNIZ-NAVEIRO, O.; MOREDA-PINEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 439, 211-227, 2001.
24. SANTOS, W. C. **Contribuição para Avaliação da Influência do Tratamento Preliminar de Amostra sobre a Confiabilidade das Informações Analíticas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2012.

25. LIMA, E. C.; BARBOSA, F.; KRUG, F. J.; SILVA, M. M.; VALE, M. G. R. Comparison of ultrasound-assisted extraction, slurry sampling and microwave-assisted digestion for cadmium, copper and lead determination in biological and sediment samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15, 995-1000, 2000.
26. CAPELO, J. L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction of cadmium from slurried biological samples for electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 13, 1285-1290, 1998.
27. DE LA CALLE, I.; CABALEIRO, N.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction of antimony and cobalt from inorganic environmental samples using a cup-horn sonoreactor prior to their determination by electrothermal-atomic absorption spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 91, 1401-1411, 2011.
28. TEIXEIRA, L. S.; VIEIRA, H. P.; WINDMOLLER, C. C.; NASCENTES, C. C. Fast determination of trace elements in organic fertilizers using a cup-horn reactor for ultrasound-assisted extraction and fast sequential flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 119, 232-239, 2014.
29. CANEPARI, S.; CARDARELLI, E.; GHIGHI, S.; SCIMONELLI, L. Ultrasound and microwave-assisted extraction of metals from sediment: a comparison with the BCR procedure. **Talanta**, 66, 1122-1130, 2005.
30. DAVIDSON, C. M.; DELEVOYE, G. Effect of ultrasonic agitation on the release of copper, iron, manganese and zinc from soil and sediment using the BCR three stage sequential extraction. **Journal of Environmental Monitoring**, 3, 398-403, 2001.
31. DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Application of ultrasound-assisted acid leaching procedure for major and trace elements determination in edible seaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Talanta**, 66, 937-942, 2005.
32. NASCENTES, C. C.; KORN, M.; ARRUDA, M. A. Z. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. **Microchemical Journal**, 69, 37-43, 2001.
33. YEBRA-BIURRUN, M. C.; MORENO-CID, A.; CANCELA-PÉREZ, S. Fast on-line ultrasound-assisted extraction coupled to a flow injection-atomic absorption spectrometric system for zinc determination in meat samples. **Talanta**, 66, 691-695, 2005.
34. BALARAMA KRISHNA, M. V.; MANJUSHA RANJIT, D.; KARUNASAGAR, D.; ARUNACHALAM, J. A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CVAAS. **Talanta**, 67, 70-80, 2005.
35. HUERGA, A.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Speciation of the immediately mobilisable As(III), As(V), MMA and DMA in river sediments by high performance liquid chromatography–hydride generation–atomic fluorescence spectrometry following ultrasonic extraction. **Analytica Chimica Acta**, 534, 121–128, 2005.

36. YEBRA-BIURRUN, M. C.; CANCELA-PÉREZ, S.; MORENO-CID-BARINAGA, A. Coupling continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometric detection for the determination of cadmium and lead in mussel samples. **Analytica Chimica Acta**, 533, 51-56, 2005.
37. MELO, M. H. A.; COSTA, A. C. S.; NÓBREGA, J. A.; FERREIRA, S. L. C. The use of water soluble tertiary amine reagent for solubilization and metal determination in fish muscle tissue. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 16, 69-73, 2005.
38. LÓPEZ-GARCÍA, I.; CAMPILLO, N.; ARNAU-JEREZ, I.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of germanium in soils using ultrasound-assisted leaching. **Analytica Chimica Acta**, 531, 125-129, 2005.
39. CABAÑERO, A. I.; MADRID, Y.; CÁMARA, C. Enzymatic probe sonication extraction of Se in animal-based food samples: a new perspective on sample preparation for total and Se speciation analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 381, 373-379, 2005.
40. CAPELO, J. L.; FILGUEIRAS, A. V.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Solid-liquid extraction of copper from slurried samples using high intensity probe sonication for electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 50, 905-911, 1999.
41. BERMEJO-BARRERA, P.; MUÑIS-NAVEIRO, O.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A. Experimental designs in the optimisation of ultrasonic bath-acid-leaching procedures for the determination of trace elements in human hair samples by atomic absorption spectrometry. **Forensic Science International**, 107, 105-120, 2000.
42. LIVA, M.; MUÑOZ-OLIVAS, R.; CÁMARA, C. Determination of Cd in sonicate slurries and leachates of biological and environmental materials by FI-CV-AAS. **Talanta**, 51, 381-387, 2000.
43. SANTOS, F. C.; ALAVA-MORENO, F.; LAVILLA, I. BENDICHO, C. Total As in seafood as determined by transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry-longitudinal Zeeman background correction: An evaluation of automated ultrasonic slurry sampling, ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15, 987-994, 2000.
44. RÍO-SEGADE, S.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection cold vapor technique. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 14, 263-268, 1999.
45. FILGUEIRAS, A. V.; CAPELO, J. L.; LAVILA, I. BENDICHO, C. Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 53, 433-441, 2000.
46. PÉREZ-CID, B.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Speeding up of a three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound. **Analytica Chimica Acta**, 360, 35-41, 1998.

47. CAPELO, J. L.; LAVILLA, I. BENDICHO, C. Ultrasonic extraction followed by sonolysis-ozonolysis as a sample pretreatment method for determination of reactive arsenic toward sodium tetrahydroborate by flow injection-hydride generation AAS. **Analytical Chemistry**, 73, 3732-3736, 2001.
48. SANTOS JR, D. **Avaliação da extração ultrassônica para determinação de elementos em materiais de interesse agrônomo e ambiental por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2005. 121 p. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. 2005.
49. CAPELO, J. L.; MADURO C.; MOTA A. M. Evaluation of focused ultrasound and ozonolysis as sample treatment for direct determination of mercury by FI-CV-AAS. Optimization of parameters by full factorial design. **Ultrasonics Sonochemistry**, 13, 98-106, 2006.
50. JALBANI, N.; KAZI, T. G.; ARAIN, B. M.; JAMALI, M. K.; AFRIDI, H. I.; SARFRAZ, R. A. Application of factorial design in optimization of ultrasonic-assisted extraction of aluminum in juices and soft drinks. **Talanta**, 70, 307-314, 2006.
51. SALGADO, S. G.; NIETO, M. A. Q.; SIMON, M. M. B. Optimisation of sample treatment for arsenic speciation in alga samples by focused sonication and ultrafiltration. **Talanta**, 68, 522-527, 2006.
52. de SOUZA, R. M.; SARACENO, A. L.; DUYCK, C.; da SILVEIRA, C. L. P; AUCELIO, R. Q. Determination of Fe, Ni and V in asphaltene by ICP OES after extraction into aqueous solutions using sonication or vortex agitation. **Microchemical Journal**, 87, 99-103. 2007.
53. JALBANI, N.; KAZI, T. G.; JAMALI, M. K.; ARAIN, M. B.; AFRID, H. I.; SHEERAZI, S.T.; ANSARI, R. Application of fractional factorial design and Doehlert matrix in the optimization of experimental variables associated with the ultrasonic-assisted acid digestion of chocolate samples for aluminum determination by atomic absorption spectrometry. **Journal of AOAC International**, 90, 1682-1688, 2007.
54. ARAIN, M. B.; KAZI, T. G.; JAMALI, M. K.; AFRIDI, H. I.; JALBANI, N.; MEMON, A. R. Ultrasound-assisted pseudodigestion for toxic metals determination in fish muscles followed by electrothermal atomic absorption spectrophotometry: Multivariate strategy. **Journal of AOAC International**, 90, 1118-1127, 2007.
55. de SOUZA, R. M.; SARACENO, A. L.; da SILVEIRA, C. L. P; AUCELIO, R. Q. Determination of trace elements in crude oil by ICP OES using ultrasound-assisted acid extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 21, 1345-1349, 2006.
56. CESPON-ROMERO, R. M.; YEBRA-BIURRUN, M. C. Flow injection determination of lead and cadmium in hair samples from workers exposed to welding fumes. **Analytica Chimica Acta**, 600, 221-225, 2007.

